植物分类学报 36(5):403~410(1998)
Acta Phytotaxonomica Sinica

铁破锣属的系统位置——ITS(nrDNA)序列证据*

汪小全 邓峥嵘 洪德元
(中国科学院植物研究所系统与进化植物学开放研究实验室 北京 100093)

THE SYSTEMATIC POSITION OF *BEESIA*: EVIDENCE FROM ITS(nrDNA) SEQUENCE ANALYSIS**

WANG Xiao-Quan DENG Zheng-Rong HONG De-Yuan
(*Laboratory of Systematic and Evolutionary Botany, Institute of Botany, the Chinese Academy of Sciences*, Beijing 100093)

Abstract Discussed in the present paper is the systematic position of *Beesia*, a small ranunculaceous genus mainly distributed in SW China. Sequences of the internal transcribed spacers (ITS) and 3′ end of 5.8 S rRNA gene of *Beesia calthifolia*, *Trollius chinensis*, *Cimicifuga acerina*, *C. brachycarpa* and *Actaea asiatica* were determined by direct PCR sequencing method. The sequences of ITS-1 in the five species range from 225 bp to 232 bp in size and those of ITS-2 from 201 bp to 217 bp. *Beesia* is very similar to *Cimicifuga* and *Actaea* not only in size, sequence and G+C content of ITS, but also in sequence of 3′ end of 5.8 S rRNA gene. In PAUP analysis, *Ranunculus enysii* was used as outgroup, and the most parsimonious tree was obtained through exhaustive search. The gaps were treated respectively as missing characters and the fifth base in two analyses. The two analyses show that a monophyletic group comprising *Beesia calthifolia*, *Cimicifuga acerina*, *C. brachycarpa* and *Actaea asiatica* is strongly supported by the bootstrap value. In the monophyletic group, *Beesia calthifolia* is basal to the other three species. The present DNA sequence analysis demonstrates that the genus *Beesia* should be placed in the tribe Cimicifugeae, which is consistent with the results from phytochemistry, palynology and cytology. In addition, *Beesia* may be the most original genus in the tribe Cimicifugeae in view of simple leaf, apetalous flower and molecular evidence.

Key words *Beesia*; Trollieae; Cimicifugeae; ITS; Molecular phylogeny

摘要 对 *Beesia calthifolia* 等5种金莲花亚科植物的核糖体DNA中的内转录间隔区(ITS)序列及5.8 S rRNA基因的3′端序列进行了测定。这几种金莲花亚科植物的ITS-1的长度范围为225~232 bp, ITS-2的长度范围为201~217 bp。*B. calthifolia* 的ITS-1(227 bp)和ITS-2(215 bp)的长度及序列均与升麻属及类叶升麻属植物相近,其5.8 S rRNA基因的3′端序列也近乎与升麻属及类叶升麻属植物完全一致(仅一个碱基缺失的差异),但其在上述几方面均与金莲花属植物相差甚远。以 *Ranunculus enysii* 作为外类群,运用PAUP软件进行的系统发育分析表明: *B. calthifolia*, *Cimicifuga acerina*, *C. brachycarpa* 和 *Actaea asiatica* 形成一个单系群,并得到bootstrap分析的极强支持, *B. calthifolia* 位于这一单系群的基部。这一DNA序列分析结果与来自植物化学、孢粉学和细胞学的研究结果相吻合,更进一步支持铁破锣属是升麻族的自然成员,并可能是升麻族中一个最原始的类群。

关键词 铁破锣属;金莲花族;升麻族;ITS;分子系统发育

---

* 国家自然科学基金"九·五"重点项目(39630030)资助。

** The sequences determined in the present paper are deposited in the GenBank database (accession numbers AF055040~AF055049).

1998-01-12 收稿,1998-04-01 收修改稿。

铁破锣属 *Beesia* 是毛茛科中的一个小属，仅含 *B. calthifolia* 和 *B. deltophylla* 2个种。前者主要分布于我国西南部，后者仅分布于西藏墨脱(肖培根，1979)。Balfour & Smith (1915) 建立铁破锣属时，认为该属与白根葵属 *Glaucidium* 和北美黄连属 *Hydrastis* 相近。自铁破锣属建立以后，对其作为一个属的等级未提出任何异议，但其系统位置一直存在争议。*Hutchinson* (1923) 根据花多数和圆锥花序这2个性状将铁破锣属与黄三七属 *Souliea*、升麻属 *Cimicifuga*、类叶升麻属 *Actaea* 和黄根属 *Xanthorrhiza* 放在一起，组成升麻亚族 Subtrib. Cimicifuginae，首次提出了铁破锣属与升麻属等类群间的亲缘关系。Janchen (1949) 根据蜜叶(退化雄蕊)形态也将铁破锣属置于升麻亚族，但其升麻亚族不包括黄根属，而包括垂果升麻属 *Anemonopsis*。Tamura (1966) 在其毛茛科系统中将铁破锣属和驴蹄草属 *Caltha*、金莲花属 *Trollius*、*Megaleranthis* 属及鸡爪草属 *Calathodes* 归在一起，组成金莲花族 Trib. Trollieae (隶属金莲花亚科 Helleboroideae)，且认为铁破锣属是金莲花族向升麻族 Trib. Cimicifugeae 演化的过渡类群，他对铁破锣属的系统处理得到 Takhtajan (1987) 的支持。Tamura (1990) 对其毛茛科系统作了进一步修改，他将金莲花亚科分为铁筷子族 Trib. Helleboreae、升麻族、黑种草族 Trib. Nigelleae 和翠雀族 Trib. Delphinieae 共4个族，在铁筷子族中下设3个亚族，即驴蹄草亚族 Subtrib. Calthinae (相当于原系统中的金莲花族，但不包括铁破锣属)、铁破锣亚族 Subtrib. Beesinae (仅含铁破锣属) 和铁筷子亚族 Subtrib. Helleborinae。综上所述，该属应放在金莲花族，还是应放在升麻族，或应将该属单立出来，是铁破锣属系统位置的争论焦点。

近年来，分子系统学这一新兴交叉学科的发展给上述问题的解决提供了便利条件。核糖体 DNA 中的内转录间隔区(ITS)序列已被广泛用于植物属内、近缘属间乃至科内的系统发育研究(Baldwin *et al.*, 1995; Sang *et al.*, 1995)，但 ITS 序列分析在毛茛科中的研究实例还很少(Ro, McPheron, 1997; Hodges, Arnold, 1994)。本文从金莲花族和升麻族中选择代表类群(包括铁破锣属)，分别测定这些类群的 ITS 序列，并利用 GenBank 中其它毛茛科植物的 ITS 序列进行系统发育分析，从分支分类学和遗传距离角度探讨铁破锣属的系统位置。

1 材料与方法

1.1 材料来源

5种金莲花亚科植物(均属金莲花族或升麻族)自野外引入温室栽培，其来源见表1。

表1 材料来源

Table 1 The origin of materials

Species	Locality	Voucher
Cimicifuga acerina (Sieb. et Zucc.) Tanaka	Mt. Jinfo, Nanchuan, Sichuan	Wang Xiao-quan 90131
Cimicifuga brachycarpa Hsiao	Mt. Jinfo, Nanchuan, Sichuan	Wang Xiao-quan 938231
Actaea asiatica Hara	Xiaolongmen, Beijing	Wang Xiao-quan 91728
Beesia calthifolia (Maxim.) Ulbr.	Mt. Ziyun, Xinning, Hunan	Yang Qin-er 941
Trollius chinensis Bunge	Mt. Baihua, Beijing	Wang Xiao-quan 93731

1.2 总 DNA 提取

用于 DNA 提取的材料均为新鲜叶片(取自温室栽培的个体)，总 DNA 提取方法为 CTAB 法(Rogers, Bendich, 1988)，但当 1V CTAB 沉淀液沉淀 DNA 的产率很低时，将上清液继续用 1V 异丙醇沉淀。

1.3 ITS 序列的获得

用于 ITS 扩增的引物、ITS 的扩增及纯化方法、测序反应及检测方法同汪小全和李振宇(1998)。*Trollius ranunculoides*，*Coptis trifolia* 和 *Ranunculus enysii* 的 ITS 序列取自 GenBank (Accession number 分别为 X83849、X83846 和 X83848)，并仅含 ITS-2 序列(Oxelman, Liden, 1995)。

1.4 序列分析及系统树构建

ITS-1 的范围根据水稻 rDNA 序列(Takaiwa *et al.*, 1985)确定，ITS-2 的范围根据 *Trollius ranunculoides* 的 ITS-2(Oxelman, Liden, 1995)确定。序列排列用 CLUSTAL V 软件(Higgins, 1994)完成。排列好的序列用 PAUP 3.1.1 系统发育分析软件进行分析(Swofford, 1993)，碱基处理作 Fitch 性状(无序)，缺隙(gap)分别处理作缺失(missing)和第五碱基(fifth base)状态作 2 种分析，*Ranunculus enysii* 作为外类群。最简约树采用竭力法(Exhaustive)寻找。为进一步判断简约树中各分支的可信度，本文采用 bootstrap 检验方法(500 次重复)。

2 实验结果

本文共测得 5 种金莲花亚科植物的 ITS-1 和 ITS-2 的完整序列以及 5.8 S rRNA 基因 3′端的 85 个碱基序列。ITS-1 的长度范围为 225～232 bp，ITS-2 的长度范围为 201～217 bp，*Beesia calthifolia* 的 ITS-1(227 bp) 和 ITS-2(215 bp)在长度及 GC 含量上均与升麻属及类叶升麻属植物相近，但 *Trollius chinensis* 的 ITS-1 序列中的 GC 含量显著高于其它 4 种金莲花亚科植物(表 2)。

表 2　铁破锣与其它 4 种金莲花亚科植物的 ITS-1 和 ITS-2 的长度及其 GC 含量
Table 2　Sizes and percent G+C content of ITS-1 and ITS-2 of *Beesia calthifolia* and other four species of the subfamily Helleboroideae

Species	ITS-1		ITS-2	
	Size(bp)	G+C(%)	Size(bp)	G+C(%)
Cimicifuga brachycarpa	225	45	215	51
Cimicifuga acerina	225	44	215	53
Actaea asiatica	226	43	217	49
Beesia calthifolia	227	45	215	51
Trollius chinensis	232	53	201	54

排列后的 ITS-1，5.8 S rRNA 基因 3′端及 ITS-2 序列见图 1，*Beesia calthifolia* 的 ITS 序列与升麻属及类叶升麻属植物的 ITS 序列间的同源性程度很高，但其与金莲花属植物 ITS 序列间的同源性程度很低。*Trollius chinensis* 的 5.8 S rRNA 基因 3′端序列与铁破锣属、升麻属及类叶升麻属植物相比均有较大差异(共发生 4 个碱基替换及一个碱基

```
                ITS-1   10         20         30         40         50         60         70         80         90         100
                        *          *          *          *          *          *          *          *          *          *
Cimicifuga brachycarpa  TCGAAACCTGCTTTGCAGAACGACCCGTGAACACGTTAAAAAAACATTAT-GTGGATTGAGGAGGAGCATGAGCTCTTAATCAT-CCATTGTCGAGTCATG
Cimicifuga acerina      ..................T...........T.............-A.......T....G..G.............-.........G.C....
Actaea asiatica         ..................................................-.........T......TG.............-.........AG......
Beesia calthifolia      .............C..........YY.A.................G..-A.............G.TG...A..........-.........G......
Trollius chinensis      .............C.......................G...C....C.G.T..A.GGC...AGA.G..GCA...C..CG..TG.A.........G......

                        110        120        130        140        150        160        170        180        190        200
                        *          *          *          *          *          *          *          *          *          *
Cimicifuga brachycarpa  GGATCGACCACGGTTGAT--CTTATGCTCTCGTACAAACACAAAACCCGGCGCAATTGGCGTCAAGGAAATCTTAGTGGAAACAAAGTGTTGCCC-ATTT
Cimicifuga acerina      ...........A.....--.C.....................T........A..G.....................C.............C....-....
Actaea asiatica         ....T.............--.........T..............T.........A.....................C.......G......A...-....
Beesia calthifolia      ..............C.TCGA.C.G.....................A.....................C.............CAT.A-T...
Trollius chinensis      ........TT....C.---A.C.G.....C.....G.........-T......TG.A.CA..C.....................C.......G..C..A.T..TG...

                        210        220        230
                        *          *          *
Cimicifuga brachycarpa  -----ATAGT-GGGCGATGCTACGAATCCGATACTT
Cimicifuga acerina      -----.....-..T.......G......TA......
Actaea asiatica         -----.....T..........T..............
Beesia calthifolia      -----...A.T..-....A..GT..T...A.....C
Trollius chinensis      GAAAC.....G..A.T.C..CG..............

                5.8S    10         20         30         40         50         60         70         80
                        *          *          *          *          *          *          *          *
Cimicifuga brachycarpa  AGAATCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAGGCCATTTAGGTTGAGGGCACGTCTGCCTGGGCGTCACAC
Cimicifuga acerina      ...G.....................................................................................
Actaea asiatica         .....................................................................................
Beesia calthifolia      ..................................................-..................................
Trollius chinensis      ..............................................T..C.-..A.C.....................................
```

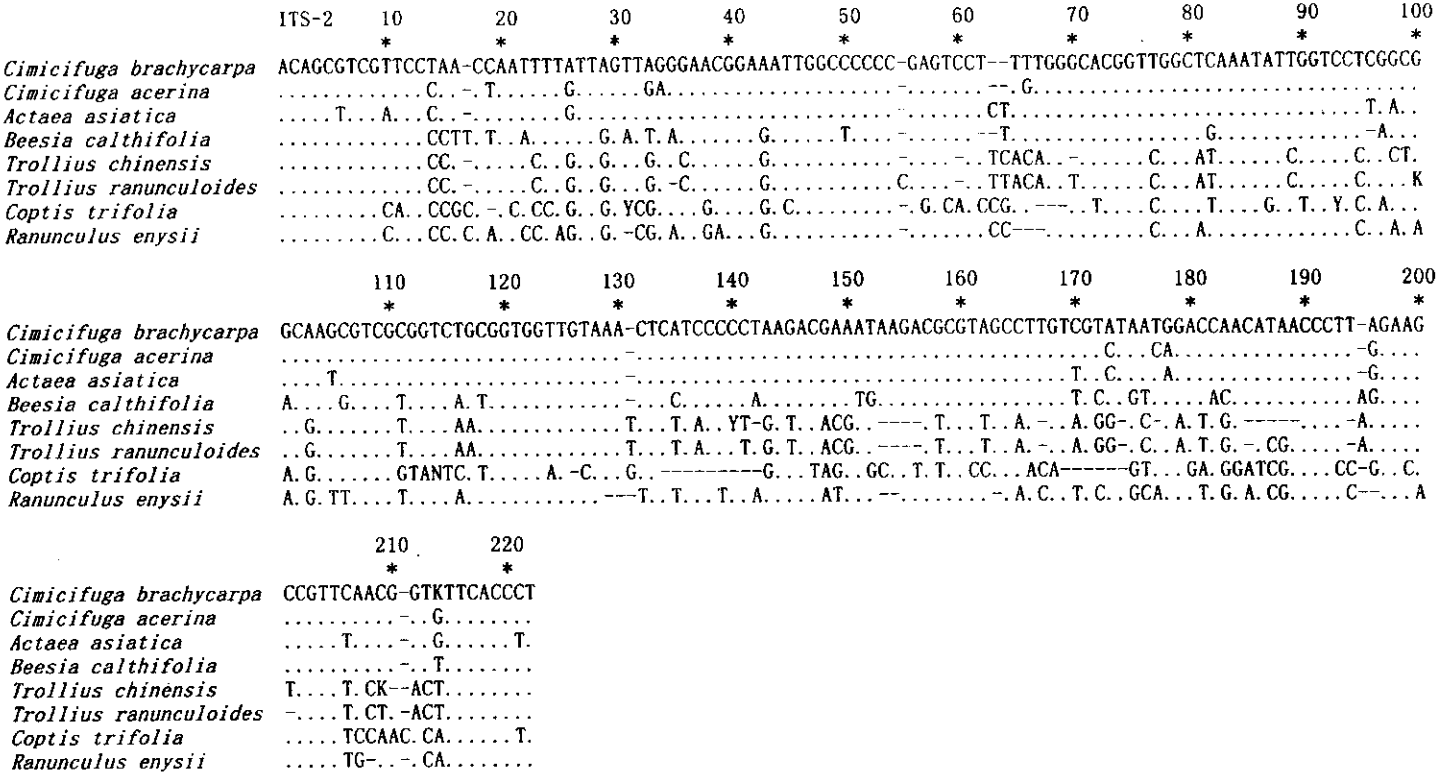


图1　排列后的ITS-1、5.8 S rRNA基因的 3' 端部分及ITS-2序列。*Trollius ranunculoides*、*Coptis trifolia*和*Ranunculus enysii*仅含ITS-2序列，其ITS-1序列处理作缺失数据。圆点表示与*Cimicifuga brachycarpa* 对应位置的核苷酸相同，横线表示缺隙(gap)。

Fig.1　Aligned sequences of ITS-1, 3' end of 5.8 S rRNA gene and ITS-2. The ITS-1 sequences of *Trollius ranunculoides*, *Coptis trifolia* and *Ranunculus enysii* were treated as missing data. Dots in the lines indicate sequence identity with *Cimicifuga brachycarpa*, dashes are gaps required for alignment. Asterisks and numbers indicate positions of nucleotides that are numbered consecutively from the 5' to 3'.

缺失),相反,*Beesia calthifolia* 与升麻属及类叶升麻属植物在 5.8 S rRNA 基因 3′端序列上的差异很小(仅一个碱基缺失事件)。PAUP 分析得到 5 种金莲花亚科植物的 ITS 及部分 5.8 S rRNA 基因序列间的绝对遗传距离(核苷酸差异数)和平均遗传距离见表 3。

表 3 铁破锣与其它 4 种金莲花亚科植物的 ITS 及 5.8 S rRNA 基因 3′端序列间的绝对遗传距离和平均遗传距离

Table 3 Pairwise genetic distances of ITS and partlial 5.8 S rRNA gene (3′ end) sequences of *Beesia calthifolia* and other 4 species in the Helleboroideae

		1	2	3	4	5
1	*Cimicifuga brachycarpa*	–	0.057	0.050	0.109	0.200
2	*Cimicifuga acerina*	30	–	0.070	0.115	0.214
3	*Actaea asiatica*	26	37	–	0.126	0.221
4	*Beesia calthifolia*	57	60	66	–	0.232
5	*Trollius chinensis*	101	108	112	117	–

Beesia calthifolia 与 *Trollius chinensis* 间的平均遗传距离(0.232)是其与升麻属及类叶升麻属植物间平均遗传距离(0.109～0.126)的两倍左右,且 *Trollius chinensis* 与升麻属及类叶升麻属植物间的平均遗传距离(0.200～0.221)均很大。

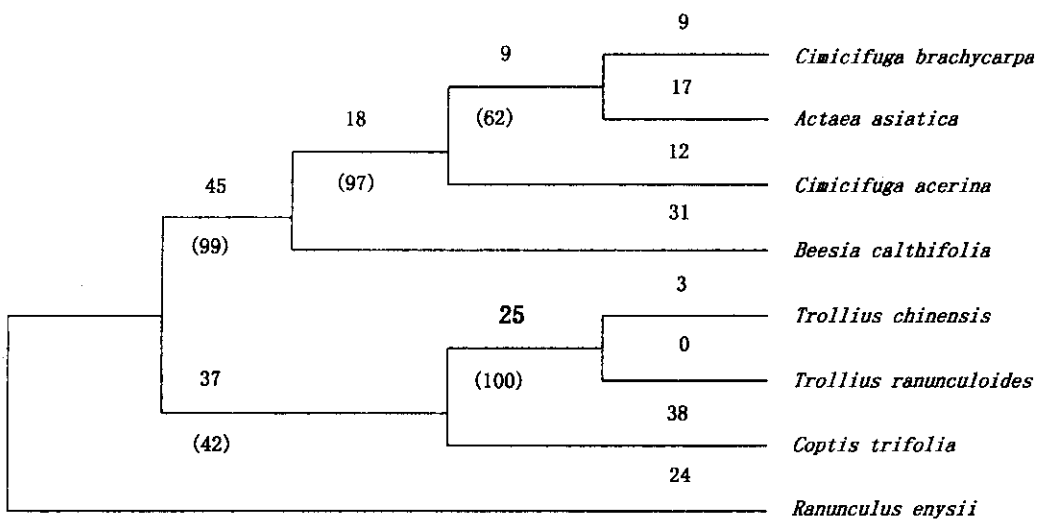


图 2 基于 ITS 及 5.8 S rRNA 基因 3′端序列分析构建的毛茛科 6 属、8 种植物的系统树。分支上的数值表示碱基替换的数目,括号内的数值表示 bootstrap 分析对该分支的支持强度(百分比)。该系统树的长度为 268 步,其 CI 值和 RI 值分别为 0.877 和 0.734。

Fig. 2 One of two most parsimonious trees constructed from sequence analysis of ITS and partial 5.8 S rRNA gene (3′end) of 8 species of 6 genera in the Ranunculaceae. The tree has 268 steps, with CI = 0.877 and RI = 0.734. Bootstrap values in parentheses are indicated below the branches, and the other values on the branches indicate the number of substitutions.

当 gap 处理作缺失状态时,用 Exhaustive 法寻找得到两个最简约树,其中一个简约树如图 2 所示。该简约树的长度为 268 步,其一致性指数(CI)和维持性指数(RI)值分别为 0.877 和 0.734。*Beesia calthifolia*, *Actaea asiatica*, *Cimicifuga brachycarpa* 和 *Cimicifuga acerina* 形成一个单系群,并得到了 bootstrap 分析的极强支持(99%),*Beesia calthifolia*

位于这一单系群的基部，它与升麻属及类叶升麻属植物拥有 45 个共衍征。另一个简约树的结构与图 2 极为相似，仅 *Coptis trifolia* 位于所有其它内类群基部而略有差异。当 gap 处理作第五碱基状态时，竭力法寻找仅得到一个最简约树，该简约树的结构与图 2 完全一致，且由 *Beesia calthifolia*，*Actaea asiatica*，*Cimicifuga brachycarpa* 和 *Cimicifuga acerina* 组成的单系群得到了 bootstrap 分析的 100% 支持。

3　讨　论

3.1　铁破锣属是升麻族的自然成员

植物化学研究表明铁破锣属植物与升麻族植物(sensu Tamura, 1966)均较特殊，均不含毛茛科的特征性化学成分 —— 毛茛甙或木兰花碱(肖培根，1980)；孢粉学研究表明铁破锣属与升麻族植物具有类似的花粉外壁纹饰及花粉壁结构(Wang *et al.*, 1993)；细胞学研究表明铁破锣属与升麻族植物具有极为相似的核型，尤其是共有 5 对大型的 m 染色体(Wang *et al.*, 1994；杨亲二等，1995)。相反，铁破锣属与金莲花族植物(sensu 王文采，1979)在上述几方面均相差甚远。本文的 ITS 序列分析进一步表明：(A) 铁破锣属不仅在 ITS 的长度及 GC 含量上与升麻属及类叶升麻属植物相近，而且其 ITS 序列与升麻属及类叶升麻属植物的 ITS 序列具有很高的同源性，排序时需要插入的 gap 少且短(除一个两碱基 gap 外，其它均为一个碱基)；相反，铁破锣属的 ITS 序列与金莲花属植物的 ITS 序列间的同源性程度很低。(B) 铁破锣属的 5.8 S rRNA 基因 3′端序列与升麻属及类叶升麻属植物近乎完全一致(仅一个碱基缺失的差异)，而与金莲花属植物的 5.8 S rRNA 基因 3′端序列相比发生了 4 个碱基转换。5.8 S rRNA 基因是一个高度保守的结构基因，Suh *et al.* (1993)研究发现整个林仙科 Winteraceae 植物的 5.8 S rRNA 基因全序列中仅有 6 个位点发生变异，金莲花属植物的 5.8 S rRNA 基因 3′端的 85 个碱基中却有 4 个碱基与铁破锣属植物有差异，这无疑说明铁破锣属植物与金莲花属植物关系较远。上述事实均说明铁破锣属与升麻属及类叶升麻属所属的升麻族植物具有很近的亲缘关系，而与金莲花属所属的金莲花族植物间的关系较远，铁破锣属是升麻族的一个自然成员。这一结论在最简约树(图 2)上同样得到反映，即铁破锣与升麻属及类叶升麻属植物构成一个单系群，且这一单系群得到 bootstrap 分析的 99% 支持。

3.2　铁破锣属在升麻族中的系统位置

Tamura (1966) 将铁破锣属置于金莲花族主要依据该属具单叶、根状茎不发达、有限花序、花少并稀疏排列、无花瓣、花序与地上茎不能截然分开等特征，但这些性状并不仅仅出现于金莲花族中，其中一部分性状(如单叶、有限花序)是毛茛科植物的祖征，另一部分性状(如花瓣)在毛茛科中不是单次起源的，因而这些性状不适用于较高分类等级(如族)的系统划分。事实上，角叶铁破锣 *B. deltophylla* 的叶基部呈耳状突出，已呈现向三出复叶演化的趋势；铁破锣属植物虽无发达的根状茎，但其根状茎的形态与升麻族植物极为相似，而与金莲花族植物相差甚远；铁破锣的花序(复聚伞花序)明显是聚伞花序向升麻族的复总状花序过渡的中间类型，因此铁破锣属的很多形态特征也可与升麻族植物联系起来。尽管如此，铁破锣属的单叶和无花瓣两个特征相对于同族的黄三七属、垂果升麻属、升麻属及类叶升麻属是较原始的，它与升麻属及类叶升麻属间的遗传距离明显大于升麻属与

类叶升麻属间的遗传距离(表3),其在简约树上也位于升麻族其它成员的基部,因此铁破锣属可能是升麻族植物中最原始的一个类群。

致谢 杨亲二先生提供部分实验材料,特此致谢。

参 考 文 献

王文采, 1979. 毛茛科. 中国植物志.第27卷. 北京:科学出版社

肖培根, 1979. 铁破锣属. 中国植物志.第27卷. 北京: 科学出版社

肖培根, 1980. 中国毛茛科植物群的亲缘关系、化学成分和疗效间相关性的初步探索. 植物分类学报, 18(2): 142~153

杨亲二, 顾志建, 孙航, 1995. 角叶铁破锣的核型及其系统学意义. 植物分类学报, 32(3): 225~229

汪小全, 李振宇,1998. rDNA片段的序列分析在苦苣苔亚科系统学研究中的应用. 植物分类学报, 36(2): 97~105

Baldwin B G, Sanderson M J, Porter J M *et al*., 1995. The ITS region of nuclear ribosomal DNA: a valuable source of evidence on angiosperm phylogeny. Ann Missouri Bot Gard, 82: 247~277

Balfour B, Smith W W, 1915. *Beesia* —— A new genus of Ranunculaceae from Burma and Yunnan. Not Bot Gard Edinb, 9: 63

Higgins D G, 1994. CLUSTAL V: Multiple alignment of DNA and protein sequences. In: Griffin A M, Griffin H G eds. Computer analysis of sequence data. Part Ⅱ. Totowa. New Jersey: Humana Press. 307~318

Hodges S A, Arnold M L, 1994. Columbines: A geographically widespread species flock. Proc Natl Acad Sci USA, 91: 5129~5132

Hutchinson J, 1923. Contributions towards a phylogenetic classification of flowering plants (I). Kew Bull, 1923: 65~89

Janchen E, 1949. Die systemstische Gliederung der Ranunculaceen und Berberidaceen. Denkshr Akad Wiss Wien Math Naturw Kl, 108(4): 1~82

Oxelman B, Liden M, 1995. The position of *Circaeaster* —— evidence from nuclear ribosomal DNA. Pl Syst Evol, 9: 189~193

Ro K E, McPheron B A, 1997. Molecular phylogeny of the *Aquilegia* group (Ranunculaceae) based on internal transcribed spacers and 5.8 S nuclear ribosomal DNA. Biochem Syst Ecol, 25(5): 445~461

Rogers S O, Bendich A J, 1988. Extraction of DNA from plant tissues. Pl Molec Biol Manual, A6: 1~10

Sang T, Crawford D J, Stuessy T F, 1995. Documentation of reticulate evolution in peonies (*Paeonia*) using internal transcribed spacer sequences of nuclear ribosomal DNA: Implication for biogeography and concerted evolution. Proc Natl Acad Sci USA, 92: 6813~6817

Suh Y, Thien L B, Reeve H E, Zimmer E A, 1993. Molecular evolution and phylogenetic implications of internal transcribed spacer sequences of ribosomal DNA in Winteraceae. Amer J Bot, 80: 1042~1055

Swofford D L, 1993. PAUP: Phylogenetic Analysis Using Parsimony, Version 3.1.1. Computer program distributed by the Illinois Natural History Survey, Champaign, Illinois.

Takaiwa F, Oono K, Sugiura M, 1985. Nucleotide sequence of the 17S-25S spacer region from rice rDNA. Pl Molec Biol, 4: 355~364

Takhtajan A, 1987. System Magnoliophytorum. Leningrad: Officina Editoria "Nauka"

Tamura M, 1966. Morphology, ecology and phylogeny of the Ranunculaceae Ⅵ. Sci Rep Osaka Univ, 15(1): 13~35

Tamura M, 1990. A new classification of the family Ranunculaceae 1. Acta Phytotax Geobot, 41: 93~101

Wang X Q, Hong D Y, Li Z Y, 1993. A study on pollen and seed coat in the tribe Cimicifugeae and some allied genera (Ranunculaceae). Cathaya, 5: 131~149

Wang X Q, Li Z Y, Hong D Y, 1994. A karyomorphological study of nine species in four genera of Ranunculaceae. Cathaya, 6: 43~56